

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-505464

(43) 公表日 平成9年(1997)6月3日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 21/78		0276-2J	G 0 1 N 21/78	C
33/53		0276-2J	33/53	M
33/566		0276-2J	33/566	
33/58		0276-2J	33/58	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-509934
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)9月21日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)3月22日
 (86) 国際出願番号 PCT/US 94/10732
 (87) 国際公開番号 WO 95/08644
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)3月30日
 (31) 優先権主張番号 08/124,686
 (32) 優先日 1993年9月22日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 イゲン, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 20852 メリーランド州,
 ロックビル, イースト ジェファークソン
 ストリート 1530
 (72) 発明者 ケンテン, ジョン
 アメリカ合衆国 20841 メリーランド州
 ボイズ, シュガー リッジ テラス
 21021
 (72) 発明者 スミス, ロジャー
 アメリカ合衆国 21755 メリーランド州
 ジェファークソン, ミルフォード コート
 4660
 (74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自立性配列複製電気化学発光核酸測定法

(57) 【要約】

本発明は目的の核酸配列を検出し定量するための改良方法に関する。本方法は一本鎖RNA、一本鎖DNA、二本鎖DNAを合成し、次いで電気化学ルミネッセント標識結合種を用いて検出することを含む。図は核酸中へのポリメラーゼ取込みのための電気化学発光標識ヌクレオチドを表している。

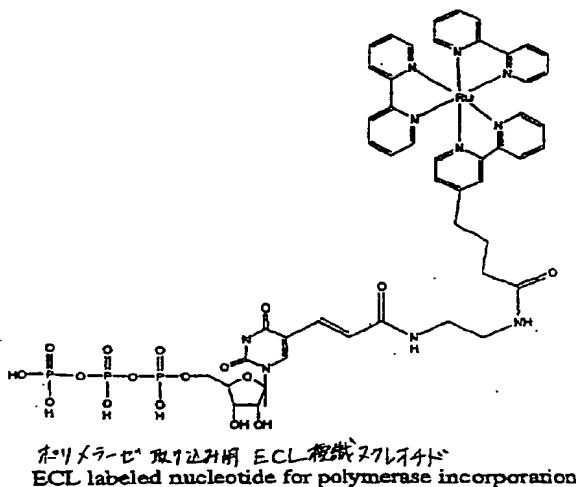


Figure 7

【特許請求の範囲】

1. 特定の核酸配列の検出方法であって、以下の工程からなる方法：

- (a) (i) 第一のオリゴヌクレオチドプライマー、
 - (ii) プロモーターのアンチセンス配列からなる第二のオリゴヌクレオチドプライマー、
 - (iii) 該プロモーターを認識するDNA依存性RNAポリメラーゼ、
 - (iv) RNA依存性DNAポリメラーゼ、
 - (v) DNA依存性DNAポリメラーゼ、
 - (vi) 一本鎖又は二本鎖のRNA又はDNAを加水分解することなくRNA-DNAハイブリッドのRNAを加水分解するリボヌクレアーゼ、及び
 - (vii) リボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートからなる試薬を含む単一の反応媒体を提供する工程、
- (b) 上記反応媒体中に、上記特定の核酸配列又は該特定の核酸配列に相補的な配列からなるRNA第一鋳型からなるRNAを、
 - (i) 上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーが上記RNA第一鋳型にハイブリダイズし、
 - (ii) 上記RNA依存性DNAポリメラーゼが上記RNA第一鋳型を用いて上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーの伸長によってDNA第二鋳型を合成し、これによりRNA-DNAハイブリッド中間体を形成し、
 - (iii) 上記リボヌクレアーゼが該RNA-DNAハイブリッド中間体からなるRNAを加水分解し、
 - (iv) 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーが上記DNA第二鋳型にハイブリダイズし、
 - (v) 上記DNA依存性DNAポリメラーゼが鋳型として上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて上記プロモーターを上記DNA第二鋳型の伸長によって合成し、そして
 - (vi) 上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記DNA第二鋳型を転写し、これにより上記RNA第一鋳型のコピーを提供す

る

というサイクルが起こるような条件下で提供する工程、その後

(c) 上記条件を上記特定の核酸配列の目的の増幅を達成するのに十分な時間維持し、次いで

(i) 電気化学発光種で標識された上記RNA第一鋳型に相補的な少なくとも一つのプローブ配列、

(ii) 結合種で標識された上記RNA第一鋳型に相補的な少なくとも一つの第二捕獲プローブ配列、

(iii) 上記第二プローブ配列に相補的な結合種で被覆されたビーズを添加する工程、その後で、

(d) 上記RNA第一鋳型にプローブがハイブリダイズし、上記第二捕獲プローブ上の上記結合種が上記ビーズ上の相補的な結合種と結合して、ビーズ結合複合体を形成するような、温度及び緩衝液の条件を提供する工程、次いで

(e) 上記電気化学発光種を用いて上記ビーズ結合複合体を検出する工程。

2. 上記RNA第一鋳型が該特定の核酸配列からなり、工程(B)が、

(i) 上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーが上記一本鎖RNAにハイブリダイズし、

(ii) 上記RNA依存性DNAポリメラーゼが鋳型として一本鎖RNAを使用し、上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーの伸長によってDNA第二鋳型を合成し、これによりRNA-DNAハイブリッドを形成し、

(iii) 上記リボヌクレアーゼが上記RNA-DNAハイブリッドからなるRNAを加水分解し、

(iv) 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーが上記DNA第二鋳型にハイブリダイズし、

(v) 上記DNA依存性DNAポリメラーゼが鋳型として上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して上記DNA第二鋳型の伸長によって上記プロモーターを合成し、

(vi) 上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記DNA第二鋳型を転写し、これにより上記RNA第一鋳型のコピーを提供するよ

うに、

上記反応媒体中に一本鎖RNAを提供することからなる、請求項1記載の方法。

3. 上記RNA第一鋳型が該特定の核酸配列に相補的な配列からなり、工程(B)が、

(i) 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーが上記一本鎖RNAにハイブリダイズし、

(ii) 上記RNA依存性DNAポリメラーゼが鋳型として該RNAを使用して上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーの伸長によって相補的なDNAを合成し、これによりRNA-DNAハイブリッドを形成し、

(iii) 上記リボヌクレアーゼが上記RNA-DNAハイブリッドからなるRNAを加水分解し、

(iv) 上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーが上記相補的DNAにハイブリダイズし、

(v) 上記DNA依存性DNAポリメラーゼが鋳型として該相補的DNAを使用して上記第一オリゴヌクレオチドプライマーの伸長によって上記DNA第二鋳型と上記プロモーターとを合成し、

(vi) 上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記DNA第二鋳型を転写し、これにより上記RNA第一鋳型のコピーを提供するように、

上記反応媒体中に一本鎖RNAを提供することからなる、請求項1記載の方法。

4. 工程(B)が、

(i) 上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーが上記一本鎖DNAにハイブリダイズし、

(ii) 上記DNA依存性DNAポリメラーゼが鋳型として上記一本鎖RNAを使用して上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーの伸長によって上記DNA第二鋳型と上記プロモーターとを合成し、

(iii) 上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記DNA第二鋳型を転写し、これにより上記RNA第一鋳型のコピーを提供するように、

上記プロモーターのアンチセンス配列からなる一本鎖DNAを、上記反応媒体に添加することからなる請求項1記載の方法。

5. 工程(B)が、上記リボヌクレアーゼが上記RNA-DNAハイブリッドからなるRNAを加水分解するように、上記一本鎖DNAからなるRNA-DNAハイブリッドを、上記反応媒体に添加することからなる請求項4記載の方法。

6. 工程(B)が、

(i) 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーが上記一本鎖DNAにハイブリダイズし、

(ii) 上記DNA依存性DNAポリメラーゼが鋳型として該第二のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して上記DNA第二鋳型の伸長によって上記プロモーターを合成し、

(iii) 上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記DNA第二鋳型を転写し、これにより上記RNA第一鋳型のコピーを提供するように、

上記DNA第二鋳型からなる一本鎖DNAを、上記反応媒体に添加することからなる請求項1記載の方法。

7. 工程(B)が、上記リボヌクレアーゼが上記RNA-DNAハイブリッドからなるRNAを加水分解するように、上記一本鎖DNAからなるRNA-DNAハイブリッドを、上記反応媒体に添加することからなる請求項6記載の方法。

8. 工程(B)が、上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記DNAを転写し、これにより上記一本鎖RNAを合成するように、上記プロモーターからなるDNAを、上記反応媒体に添加することからなる請求項2記載の方法。

9. 工程(B)が、上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記DNAを転写し、これにより上記一本鎖RNAを合成するように、上記プロモーターからなるDNAを、上記反応媒体に添加することからなる請求項3記載の方法。

10. 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーがさらに上記DNA依存性RNAポリメラーゼのための転写開始部位のアンチセンス配列からなり、該転写

開始部位のアンチセンス配列が上記プロモーターのアンチセンス配列に操作的に

結合している請求項1記載の方法。

11. 上記RNA依存性DNAポリメラーゼがレトロウイルス逆転写酵素である請求項1記載の方法。

12. 上記DNA依存性DNAポリメラーゼがエキソヌクレアーゼ活性を欠いている請求項1記載の方法。

13. 上記反応媒体中のすべてのDNAポリメラーゼがエキソヌクレアーゼ及びDNAエンドヌクレアーゼ活性を欠いている請求項1記載の方法。

14. 上記DNA依存性DNAポリメラーゼがDNAポリメラーゼ α 又はDNAポリメラーゼ β である請求項1記載の方法。

15. 以下の工程からなる増幅産物の検出方法：

(a) 試料核酸を増幅産物を発生する条件下で増幅する工程、

(b) 上記増幅産物を、

(i) 増幅された核酸及び二価結合種との三分子複合体と相互作用するECL標識結合種、

(ii) 増幅された核酸及びECL標識結合種との三分子複合体と相互作用する二価結合種

からなる二つの結合種とともに混合して結合複合体反応物を形成する工程、

(c) 上記結合複合体反応物を増幅産物、ECL標識結合種及び二価結合種の三分子複合体を形成するような条件下でインキュベートする工程、

(d) 上記三分子複合体を二価結合種の残りの結合部位を介して固相に捕獲する工程、及び

(e) 固相上に捕獲されたECL標識を定量する工程。

16. 上記増幅条件が等温的である請求項15記載の方法。

17. 上記結合種が、抗体：抗原、オリゴヌクレオチド：オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド：抗体、オリゴヌクレオチド：抗原、DNA：DNA、DNA：RNA、RNA：RNA、DNA：RNA：DNA、ビオチン-DNA：DNA-ECL標識、レセプター：リガンド、及びDNA結合タンパクからなる群より選ばれる請求項15記載の方法。

18. 以下の工程からなる試料の定量的測定方法：

(a) 未知の試料を既知の試料を用いて同じプライマーにより増幅して、未知の試料と既知の試料とのコピーを含む増幅産物の混合物を形成する工程、ただし上記既知の試料は未知の試料の配列に対して非相同性の配列を含むものである、

(b) 該増幅産物の混合物を取り、未知の試料と既知の試料とを別々に定量する工程であって、該工程が：

(i) 増幅産物の混合物を二つの結合種と別々に混合して、結合複合体反応物を形成し、ただし結合種は既知の試料配列と未知の試料配列の各々に特異的であり、

(1) 増幅された核酸と二価結合種との三分子複合体と相互作用する ECL 標識結合種；

(2) 増幅された核酸と ECL 標識結合種との三分子複合体と相互作用する二価結合種を含むものである、

(c) 上記結合複合体反応物を、増幅産物、ECL 標識結合種及び二価結合種の三分子複合体を形成するような条件下でインキュベートする工程；

(d) 上記三分子複合体を、二価結合種の残りの結合部位を介して固相に捕獲する工程、及び

(e) 上記既知の試料及び上記未知の試料について ECL を定量し、次いで、未増幅出発反応物中の未知の試料の量を測定する工程。

19. 該増幅が等温的である請求項 18 記載の方法。

20. 該試料が、核酸、増幅産物及び合成 DNA からなる群より選ばれる請求項 18 記載の方法。